



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

BRUNO FERNANDES DE MOURA PIRES

**ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Relatório de estágio apresentado
para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília.

Brasília-DF

Julho/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

BRUNO FERNANDES DE MOURA PIRES

**ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Relatório de estágio apresentado
para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília.

Orientador
Prof^a Dr^a Simone Perecmanis

Brasília-DF
Julho/2013

FICHA CATALOGRÁFICA

PIRES, Bruno Fernandes de Moura

Acompanhamento das atividades do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília / Bruno Fernandes de Moura Pires, orientação de Simone Perecmanis - Brasília, 2013.

42p.

Relatório de estágio - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Laboratório; 2. Microbiologia Médica; 3. Medicina Veterinária; 4. Identificação; 5. Isolamento.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Bruno Fernandes de Moura Pires

Título do Relatório de Estágio para Conclusão de Curso: Acompanhamento das atividades do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desse relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte desse relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Bruno Fernandes de Moura Pires

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: PIRES, Bruno Fernandes de Moura

Título: Acompanhamento das atividades do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Relatório de estágio apresentado
para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Simone Perecmanis

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

MSc. Hudson H. de Andrade

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

M.V. Luciana F. Lobo de Souza

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, por todo o apoio e amor dedicados durante esses cinco anos, por entenderem a minha escolha profissional e meu amor pelos animais.

Aos meus companheiros de turma e agora colegas de profissão por todos os bons momentos compartilhados durante a graduação.

A todos os frequentadores do laboratório de Micromédica veterinária da UnB, aos residentes Marcus Portugal, Diego Maués, Marcela Tokatjian e Luciana Lobo, aos funcionários Hudson Holanda e Ana Paula Faria e, a também estagiária curricular, Luciane Sardinha.

A minha orientadora Professora Doutora Simone Perecmanis por aceitar me orientar nessa etapa final, pelos conhecimentos compartilhados e a dedicação a mim prestados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTRUTURA FÍSICA E ROTINA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA	3
3. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE URINA.....	6
3.1. CULTURA E ISOLAMENTO	6
4. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE DIVERSAS AMOSTRAS COLETADAS COM SWAB.....	8
5. IDENTIFICAÇÃO INICIAL DE BACTÉRIAS	9
5.1. TESTE A COLORAÇÃO DE GRAM	9
5.2. TESTE KOH	10
5.3. TESTE DA CATALASE.....	11
5.4. TESTE DA OXIDASE	12
5.5. TESTE DA OXIDAÇÃO/FERMENTAÇÃO DA GLICOSE	13
6. IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS	15
6.1. CULTURA EM ÁGAR MACCONKEY®	15
6.2. CULTURA EM ÁGAR CLED®	16
6.3. CULTURA EM ÁGAR EMB®	17
6.4. TESTES BIOQUÍMICOS.....	18
a) <i>Ágar TSI® (Tríplice Açúcar Ferro)</i>	19
b) <i>Teste da Descarboxilação da Lisina</i>	20
c) <i>Outros Testes Bioquímicos Complementares</i>	22
7. TESTE DA DIFUSÃO EM DISCO (ANTIBIOGRAMA)	22
8. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS A PARTIR DE SWABS DE OUVIDO	24
8.1. CULTURA E ISOLAMENTO	25
9. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DERMATÓFITOS	26
10. CASUÍSTICA.....	28
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO I.....	33
ANEXO II.....	35

1. INTRODUÇÃO

A microbiologia tem sofrido enormes mudanças desde as pioneiras investigações de Pasteur e Koch, que há mais de 120 anos elucidaram a natureza das doenças infecciosas. Essa disciplina, que agora ocupa uma posição central no currículo da Medicina Veterinária, tem-se desenvolvido dentro de uma ampla complexidade, que varia desde a caracterização cultural e bioquímica dos microrganismos patogênicos até técnicas moleculares avançadas usadas para identificar genes associados a fatores de virulência (Quinn et al., 2005). Norteados por esta importância elucidada acima, e reconhecendo a necessidade de se dominar o conteúdo desta área acadêmica para o sucesso na carreira de Médico Veterinário, foi que se deu a escolha de concluir o curso de Medicina Veterinária com estágio curricular supervisionado no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília.

O Estágio Curricular Supervisionado é uma atividade curricular obrigatória, que corresponde à última disciplina realizada no décimo semestre da graduação do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

O objetivo da realização do estágio foi utilizar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Medicina Veterinária e vivenciar a rotina do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, a fim de obter o máximo de conhecimento na área de microbiologia veterinária e diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas, bem como noções avançadas sobre morfologia, citologia, estrutura, fisiologia, metabolismo e genética de microrganismos, classificação dos agentes microbianos, características de bactérias, fungos causadores de doenças em animais. Além disso, tendo por base o desenvolvimento de trabalho prático, para o aperfeiçoamento da formação do aluno, direcionado não só às suas preferências como futuro profissional, mas também para preparar o aluno para o mercado de trabalho permitindo a aplicação de seus conhecimentos teóricos em situações práticas.

O estagiário pode assim, junto aos residentes, técnicos e ao professor responsável familiarizar-se com as práticas laboratoriais de isolamento, identificação e classificação dos principais agentes infecciosos causadores de doenças nos animais domésticos e silvestres.

Baseando-se nessas informações, este trabalho teve como objetivo principal relatar as atividades exercidas pelo estagiário no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária pertencente à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV-UnB), no período de abril a julho de 2013, somando um total de 480 horas de estágio supervisionado.

2. ESTRUTURA FÍSICA E ROTINA DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA

O laboratório em questão localiza-se no *campus* Darcy Ribeiro da UnB e funciona de segunda a sexta-feira no horário de 8:00h às 18:00h. A responsável pelo laboratório é a professora doutora Simone Perecmanis, que é também orientadora de um grupo de estudantes do programa de pós-graduação em Saúde Animal de mestrado e doutorado, quatro residentes, três técnicos, bem como pelos diversos estudantes bolsistas e estagiários que frequentam o local.

As análises realizadas no laboratório de microbiologia podem ser divididas basicamente em dois grupos: as análises de rotina e as análises experimentais. As de rotina são realizadas para atender o hospital veterinário da UnB, bem como as solicitações de análises oriundas de clínicas veterinárias, outros hospitais, veterinários autônomos e produtores, que encaminham amostras ao laboratório para que seja feita a avaliação microbiológica cultural, identificação de microrganismos, e entre outras análises específicas requisitadas pela clínica médica.

As análises experimentais são realizadas pelos alunos do programa de mestrado e doutorado, e também por alunos graduandos em Medicina Veterinária inscritos em programas de iniciação científica, que rotineiramente são auxiliados pelos técnicos do laboratório e residentes. As linhas de pesquisa envolvem identificação de linhagens patogênicas de bactérias, métodos analíticos aplicados à microbiologia, métodos avançados em biologia molecular, como por exemplo, Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

O laboratório de microbiologia é dividido fisicamente em três salas separadas com acessos independentes: laboratório principal, sala de preparo de meios de cultura e sala de lavagem de vidrarias, como disposto na Figura 1. A sala principal possui uma bancada central, disposta horizontalmente, e bancadas que acompanham o perímetro do local, munidas de dois bicos de Bunsen. Anexados logo abaixo das bancadas encontram-se armários para armazenamento de todo tipo de equipamentos e utensílios como vidrarias, pHmetros, agitadores, estantes suporte, entre outros. Neste laboratório encontram-se também quatro microscópios ópticos, capela de fluxo laminar, freezers, geladeiras, pias e estufas. A sala de preparo de meios também possui bancada acompanhando perímetro do local, com armários para armazenamento de utensílios e vidrarias, aparelhagem, como

pHmetro, balança de precisão, banhos-marias, micro-ondas, e existem ainda duas estufas de secagem, duas pias e um armário para armazenamento dos insumos para preparo de meios de cultura, de transporte, entre outras soluções. A sala de lavagem de vidrarias possui bancada com uma pia para lavagem, uma estufa para secagem, um destilador de água e duas autoclaves.

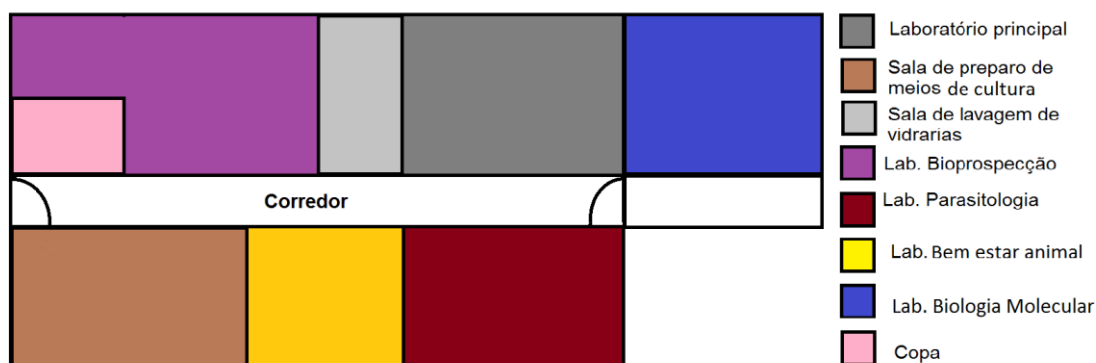


Figura 1: Croqui das dependências do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária e suas adjacências.

Fonte: Arquivo pessoal.

Além das análises de rotina e experimentais, há uma reunião composta por todos os frequentadores do laboratório que ocorre quinzenalmente, em que os alunos seguem um cronograma de apresentações montado no início de cada semestre, e apresentam seminários, artigos, debatem projetos, teses e dissertações que estão em desenvolvimento. Após o término da reunião, é aberta discussão para retirar dúvidas, questionamentos e sugestões, e por fim ocorre debate sobre o dia a dia das atividades do laboratório. Além disso o laboratório também é utilizado para realização de atividades referentes à disciplina de microbiologia veterinária do curso de Medicina Veterinária da UnB e frequentado por estudantes desta disciplina.

Com relação à segurança em laboratório, todos os novos frequentadores são advertidos no primeiro dia quanto aos equipamentos de proteção individual adotados no local, enfatizando qual é a vestimenta adequada a ser utilizada, como por exemplo, jaleco, calça comprida, sapato fechado, que devem ser utilizados em cada atividade específica. Também é abordada a importância da limpeza correta de materiais, bancada e equipamentos.

Dentre as amostras mais recebidas para análise microbiológica, isolamento e identificação de microrganismos no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, destacaram-se os raspados de pele e pelos, *swabs* de ouvido e amostras de urina, como evidenciado no Gráfico 1. Das amostras de material biológico recebido encontram-se aspirados de abscessos, articulações, derrames cavitários, líquido, conteúdo de nasofaringe, traqueia, nódulos, e saco escrotal, além de *swabs* de abscessos, ingluvie, olhos, lesões, reto. Outros tipos de amostras recebidas eram de fezes, rapados de pele e carapaça, leite, sangue, e secreções.

Os resultados dessas análises, entregues em forma de laudos, são ferramentas de fundamental importância para a conclusão do diagnóstico final dos mais variados casos clínicos, bem como servem de auxílio na escolha de abordagem para o tratamento mais adequado a ser estabelecido. As análises e procedimentos a serem descritos abaixo referem-se àquelas realizadas rotineiramente pelo estagiário, com auxílio dos residentes e técnicos, durante o período de estágio no Laboratório.

Amostras de Material Biológico

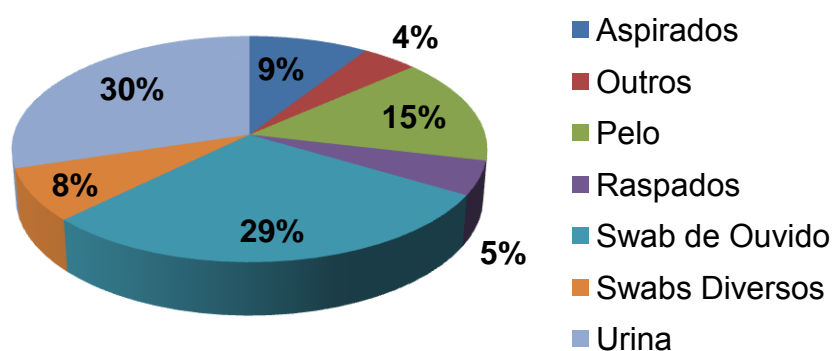


Gráfico 1: Relação dos tipos de materiais biológicos recebidos para posterior inoculação e identificação de microrganismos; Número total de amostras igual a 185.

3. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE URINA

A infecção do trato urinário se caracteriza pela presença de microrganismos patogênicos na urina. Os patógenos mais comuns são bactérias. Estas bactérias podem atacar qualquer nível do aparelho urinário, desde a bexiga, causando cistite, a uretra causando uretrite, até o rim, causando pielonefrite (Soares et al., 2006). A infecção urinária pode se manifestar de diversas maneiras, ou ser assintomática.

Essas infecções podem ser identificadas no exame de microscopia direta, pelo método de Gram e pela urocultura, sendo esta a melhor forma de diagnóstico, que não só permite a quantificação dos germes existentes na urina, como define o agente etiológico da infecção (Brasil, 2004). Durante o período do estágio foi constatado que, a maior parte das amostras de urina para análise microbiológica recebidas eram geralmente coletadas desprezando-se o jato inicial, ou frequentemente coletadas através do uso de cateteres ou por procedimento de cistocentese.

3.1. CULTURA E ISOLAMENTO

Após recebimento de amostra devidamente armazenada e transportada, homogeneizou-se a amostra e retirou-se uma alíquota do frasco ou seringa com auxílio da alça calibrada flambada e fria, realizou-se a semeadura então através de estria central em placas de meio Ágar Sangue® (Oliveira, 2000), de acordo com a Figura 2A. Inoculou-se também através de alçadas da amostra por três vezes em Caldo Tioglicolato®. Todo procedimento de inoculação da alíquota da amostra, tanto em Ágar Sangue®, quanto em Caldo Tioglicolato® foi feito dentro da área de segurança do bico de Bunsen.

O Ágar Sangue® consiste de um meio sólido enriquecido adequado para crescimento da maioria das bactérias patogênicas, inclusive as consideradas de difícil crescimento como por exemplo *Streptococcus spp.* e *Corynebacterium spp.*, como pode ser visto na Figura 2A (Biobrás). O acréscimo de sangue e conservação dos eritrócitos íntegros permite o reconhecimento da produção de hemolisinas bacterianas, favorecendo a identificação da atividade hemolítica de determinados microrganismos (Quinn et al., 2005). O Caldo Tioglicolato® é um meio semi-ágar

altamente nutritivo e versátil e dá suporte para o crescimento de vários microrganismos, sendo utilizado para a cultura de anaeróbios, microaerófilos e aeróbios em materiais de origem estéril (OXOID, 2000). A turvação do meio indica o crescimento de microrganismos, como apresentado na Figura 2B. Não havendo crescimento de microrganismos, constata-se a manutenção do meio límpido.

Findadas as inoculações, ambos os meios foram imediatamente incubados por 18-24 horas à uma temperatura constante de 37°C em estufa apropriada para culturas bacteriológicas. Decorrido o período de incubação, a placa semeada e o tubo com Caldo Tioglicolato® foram levados para análise na bancada junto a área de segurança do bico de Bunsen para observação se houve ou não crescimento bacteriano. Após o período de incubação e não identificado crescimento bacteriano e formação de colônias, os meios foram reincubados por mais 24h. Decorrido esse novo período, e então confirmando o não crescimento de qualquer colônia na área das estrias, o material foi descartado e amostra dada como negativa. Havendo o crescimento de mais de um tipo de colônia procedeu-se com o repique das mesmas ou com a descontaminação em novas placas de Ágar Sangue®. Cada colônia consiste de milhões de células de bactérias. A observação das características dessas colônias em relação ao tamanho, forma, textura, cor e reações de hemólise é altamente importante como um primeiro passo na identificação bacteriana (Quinn et al. 2005). Após o isolamento das bactérias presentes na urina, encaminhou-se para os testes de identificação dos microrganismos isolados.

Outras amostras que se apresentem na forma líquida originadas de local estéril, como aspirados de líquido, derrames cavitários e lavados traqueais foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados com as amostras de urina, sendo também inoculadas em Ágar Sangue® e Caldo Tioglicolato® e incubadas em estufa para crescimento de culturas bacteriológicas (Oliveira, 2000).

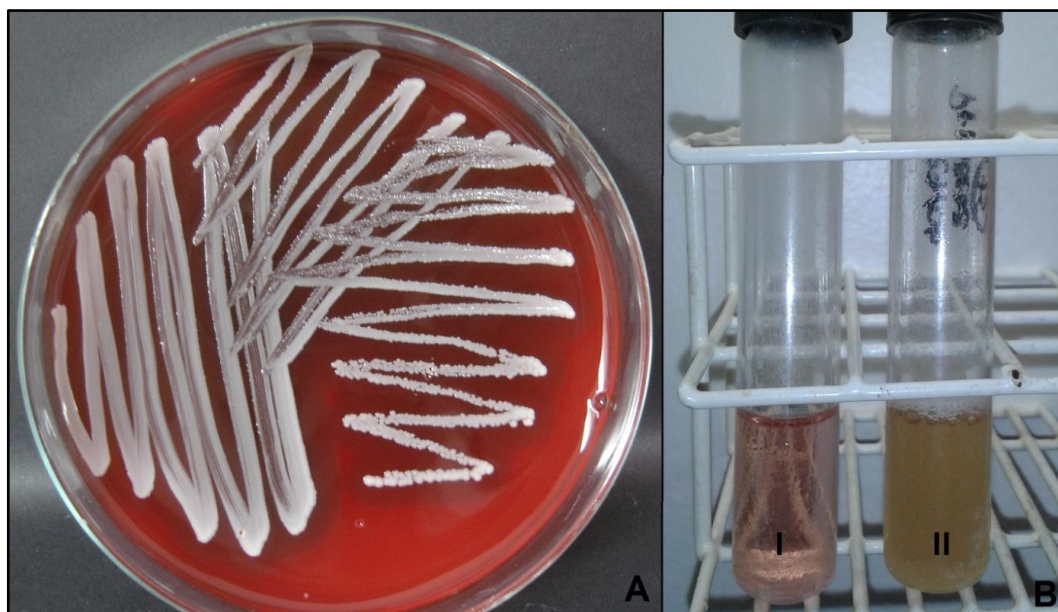


Figura 2: A – Crescimento bacteriano em placa de Petri contendo Ágar Sangue® verificado após 24h em estufa a 37°C; B – I Caldo Tioglicolato® límpido; II- Caldo Tioglicolato® turvo com presença de crescimento bacteriano após 24h em estufa a 37°C.

Fonte: Cedido por Msc. Ana Paula Faria.

4. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE DIVERSAS AMOSTRAS COLETADAS COM SWAB

A semeadura de amostras coletadas através do uso de *swabs* estéreis foi feita de forma direta sem a utilização de alças calibradas. Dentro da área de segurança do bico de Bunsen, com auxílio de uma pinça hemostática cirúrgica devidamente flambada e fria, segurou-se diretamente o *swab* e inoculou-se em meio Ágar Sangue® através de estria central (Oliveira, 2000).

Após proceder com a inoculação, a placa de Ágar Sangue® foi encaminhada para incubação por 18-24 horas à temperatura constante de 37°C na estufa para crescimento de culturas bacteriológicas (Oliveira, 2000). Após o período de incubação e tendo-se isolado colônias bacterianas, encaminhou-se o material para o procedimento dos testes de identificação das bactérias isoladas.

5. IDENTIFICAÇÃO INICIAL DE BACTÉRIAS

Inicialmente a primeira análise feita foi a observação dos aspectos macroscópicos apresentados pelas colônias nas placas de ágar. As bactérias apresentam diversas características particulares ao formarem suas colônias em cada meio específico, como hemólise, na presença de Ágar Sangue®, formato da colônia, consistência, tamanho, cor e odor. A verificação de tais aspectos se faz muito importante para se identificar através de busca na literatura disponível diferenciações entre os grupos bacterianos, para se estabelecer um diagnóstico presuntivo e direcionar os posteriores testes bioquímicos (Quinn et al., 1994).

5.1. TESTE A COLORAÇÃO DE GRAM

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares espessas das bactérias Gram-positivas em reterem o corante cristal violeta durante a exposição ao etanol, enquanto que as paredes delgadas das bactérias Gram-negativas não o conseguem. O teste consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol e safranina ou fucsina. Esta técnica permite a diferenciação de amostras bacterianas em Gram-positivas e Gram-negativas baseando-se na composição da parede bacteriana (Brasil, 2001), e favorecendo a identificação da morfologia e tamanho das bactérias.

Primeiramente colocou-se, com auxílio da alça calibrada previamente flambada e fria, uma gota de solução salina estéril sobre uma lâmina de vidro para microscopia. Então, novamente com auxílio da alça calibrada retirou-se uma parte da colônia bacteriana da cultura em Ágar e realizou-se uma pequena emulsão com a solução salina, fazendo um esfregaço homogêneo e delgado. Deixou-se o esfregaço secar a temperatura ambiente, e então se fixou pelo calor através do bico de Bunsen expondo a parte de trás da lâmina a chama, passando-a pela chama do bico por pelo menos 3 vezes (Brasil, 2001). Todo procedimento de preparo do esfregaço deve ser feito dentro da área de segurança do bico de Bunsen.

Após isto se colocou a lâmina já fria sobre o suporte para coloração, e então se cobriu esfregaço com violeta genciana e a deixou agir por 1 minuto. Inclinou-se a lâmina para que o excesso de violeta escorra, e se cobriu a lâmina desta vez com

lugol e o deixou agir também por 1 minuto. Após este minuto lavou-se rapidamente com água corrente para retirar o excesso de lugol. Então, se procedeu com a descoloração através de uso de etanol por aproximadamente 10 segundos, e promoveu o enxágue imediatamente. Por fim o esfregaço foi coberto com safranina por 30 a 45 segundos e após isto se procedeu com o enxágue através do uso de água corrente (Brasil, 2001).

Finalizado o preparo da lâmina, e esta já estando seca, procedeu-se com a visualização da mesma em microscópio óptico, por meio do uso de uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e procedeu-se com a focagem. Através da visualização na microscopia pode-se classificar então as bactérias como Gram-positivo ou Gram-negativo e quanto a sua forma em cocos, bastonetes, vibriões ou espirilos.

5.2. TESTE KOH

O teste da reação ao hidróxido de potássio (KOH) é usado como um método simples e eficaz para confirmar o resultado obtido através da coloração de Gram. O teste objetiva verificar a capacidade da parede bacteriana da amostra em resistir à ação de lise provocada pelo contato com KOH (Oliveira, 2000). Consiste em colocar uma gota de KOH 3% em uma lâmina para microscopia, previamente identificada, e com o auxílio de uma alça calibrada, devidamente flambada e fria, coleta-se parte de uma colônia presente em cultura na placa de Ágar e coloca-se em contato com a gota de KOH. Através então de movimentos circulares constantes dissolve-se a alíquota. Deve-se então observar se ocorre mudança na viscosidade do material por aproximadamente 30 segundos, levantando seguidas vezes a alça calibrada para evidenciar se há formação de um “fio” viscoso, como pode ser visto na Figura 3 (Brasil, 2010c; Oliveira, 2000). O teste deve ser sempre realizado dentro da área de segurança do bico de Bunsen.

Bactérias Gram-negativas formam o fio viscoso e são consideradas positivas no teste. Pois sua parede bacteriana não é resistente a solução de KOH 3% ocorrendo então lise celular, seu DNA entra em contato com o reagente, reage com o mesmo e forma o material viscoso evidenciado pela formação do fio. Bactérias Gram-positivas não formam o fio viscoso e são consideradas negativas no teste, pois sua parede é resistente à ação do reagente, assim não ocorre lise celular e seu material genético não é exposto ao KOH 3% (Oliveira, 2000).



Figura 3: Teste KOH positivo.

Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

5.3. TESTE DA CATALASE

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada em grande parte dos microrganismos, que tem a capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. O teste da catalase é utilizado rotineiramente na microbiologia como teste de triagem na identificação de bactérias, é muito utilizado para diferenciar *Staphylococcus spp.* (catalase positiva) e *Streptococcus spp.* (catalase negativa; Quinn et al., 2005). O teste tem por objetivo verificar se a bactéria em questão possui ou não a enzima catalase. Colocou-se uma gota de água oxigenada (10 volumes) em uma lâmina para microscopia, previamente identificada, e com o auxílio de uma alça calibrada, devidamente flambada e fria, coletou-se parte da colônia a ser testada presente em cultura na placa de ágar e a colocou em contato com a gota do reagente esfregando na lâmina. Observou-se por 30 segundos se houve formação ou não de bolhas, como evidenciado na Figura 4 (Brasil, 2010c; Oliveira, 2000).

Bactérias positivas no teste promovem a formação de bolhas por possuírem a enzima catalase. Bactérias que não possuem catalase não promovem a reação e são consideradas negativas no teste. Colônias de bactérias *Staphylococcus spp.* são utilizadas como controle positivo, assim como para controle negativo são utilizadas colônias bacterianas de *Streptococcus spp.* (Oliveira, 2000). Evita-se o uso de meios contendo sangue, pois os eritrócitos podem produzir reação de catalase, podendo promover interpretação de falsos positivos.

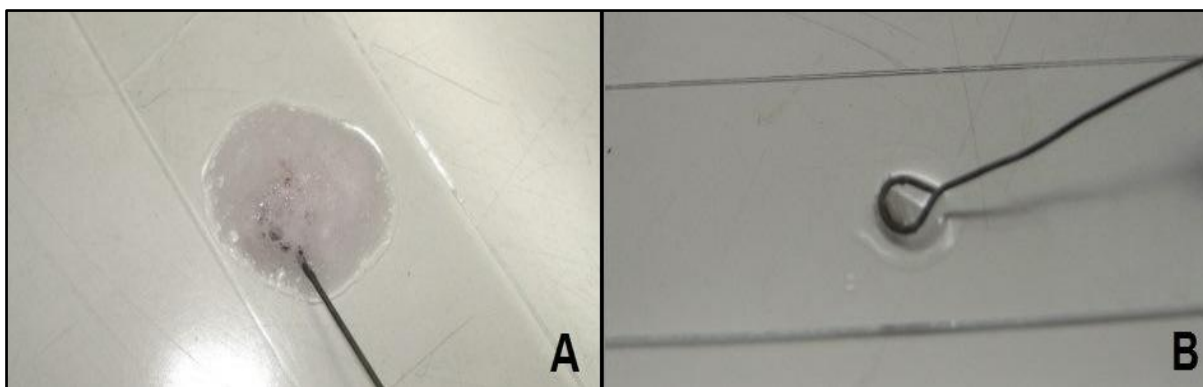


Figura 4: A - Teste de catalase positivo; B - Teste de catalase negativo.
Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

5.4. TESTE DA OXIDASE

O teste de oxidase é baseado na identificação da produção intracelular da enzima oxidase por determinada bactéria. Um teste positivo para oxidase indica a presença de citocromo oxidase C na célula bacteriana. É utilizado rotineiramente na microbiologia como método importante na triagem para identificação de bactérias, ajuda na distinção entre microrganismos não fermentadores (oxidase positiva) de enterobactérias (oxidase negativa; Quinn et al., 2005).

O teste consistiu em coletar parte de uma colônia bacteriana da cultura em ágar, através do uso de alça calibrada de platina e de uma pinça, devidamente flambadas e frias, então se esfregou contra uma fita própria para o teste de oxidase que se encontrava impregnada de reagente adequado para reação, de acordo com a Figura 5A. Observou-se por 30 segundos se houve mudança na coloração da fita, como demonstrado na Figura 5B (Brasil, 2010c; Oliveira, 2000). Para bactérias consideradas positivas no teste o esfregaço adquiriu coloração roxa, que pode se tornar preta em poucos segundos. Enquanto que no esfregaço de bactérias que não possuem a enzima oxidase, não ocorreu nenhuma alteração de cor (Oliveira, 2000). Evita-se o uso de alça ou agulha que possam conter traços de ferro, pois ela pode oxidar a fita e resultar em falso positivo.

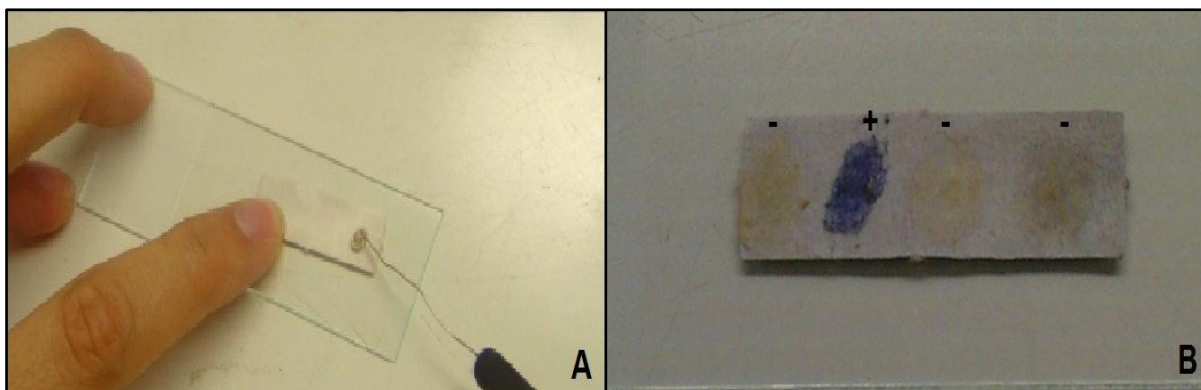


Figura 5:A - Realização do teste de oxidase; B - Teste da oxidase positivo e negativos.

Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

5.5. TESTE DA OXIDAÇÃO/FERMENTAÇÃO DA GLICOSE

O teste da oxidação/fermentação da glicose(O/F) em meio Ágar Hugh & Leifson® permite determinar o uso da via oxidativa ou fermentativa da glicose. É considerado método simples e eficaz para identificação de bactérias que utilizam a glicose em presença ou na ausência de oxigênio, e baseia-se na produção de ácido quando a glicose é metabolizada (Oliveira, 2000). Para execução do teste coletou-se parte de uma colônia bacteriana da cultura em ágar, através do uso de alça calibrada devidamente flambada e fria, e se inoculou em dois tubos distintos contendo meio O/F glicose (Hugh & Leifson®).

Em um deles há uma camada de 1mL de óleo mineral estéril, a fim de promover um ambiente de anaerobiose e testar a capacidade da bactéria em fermentar o açúcar na ausência de oxigênio. Após a inoculação, ambos os tubos foram incubados por 24 horas à temperatura constante de 37°C na estufa para crescimento de culturas bacteriológicas (Brasil, 2010c; Oliveira, 2000). Todos os procedimentos realizados no teste foram feitos dentro da área de segurança do bico de Bunsen.

Posteriormente a esse período foi feita a primeira leitura e interpretação das reações nos tubos. Considerou-se bactéria oxidativa aquela que após decorrido o período de incubação no tubo que se encontrava sem óleo, e consequentemente em aerobiose, adquiriu coloração amarelada indicando oxidação da glicose e acidificação do meio. E ao mesmo tempo o tubo que continha o óleo, assim estando em anaerobiose, tiver mantido a coloração original, como evidenciado na Figura 6A.

Considerou-se que houve fermentação da glicose, e a bactéria então foi classificada como fermentativa, quando houve mudança da cor de ambos tubos, que se tornaram amarelos, de acordo com a Figura 6B. A não utilização do açúcar é considerada quando os dois tubos permanecem com suas cores inalteradas, e estas bactérias então são consideradas não reativas ou incapazes de utilizar a glicose (Oliveira, 2000; Quinn et al., 2005).

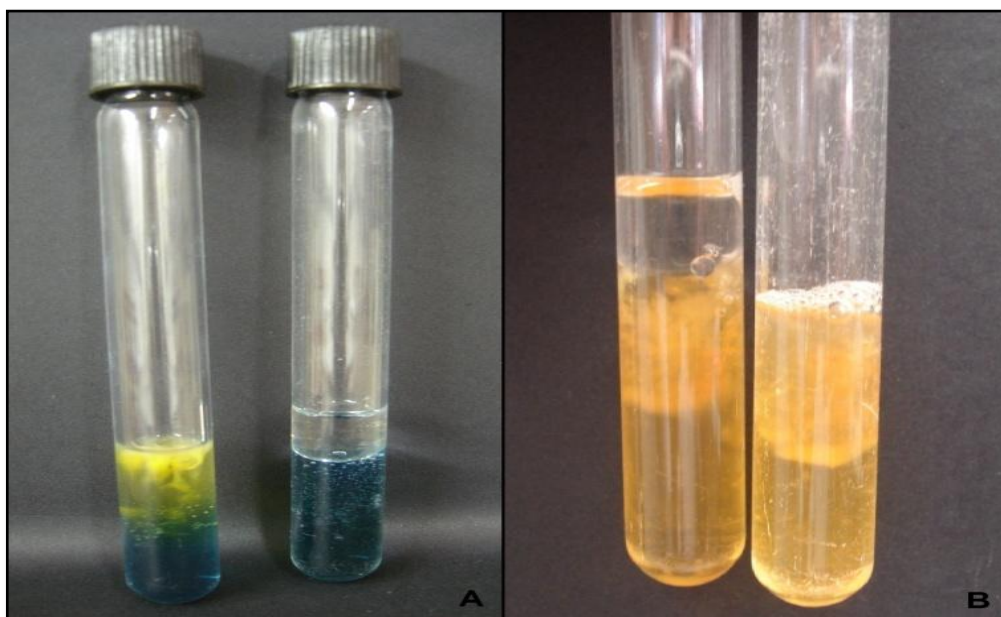


Figura 6:A - Reação oxidativa da glicose; B - Reação fermentativa da glicose.
Fonte: Cedido por Msc. Ana Paula Faria e Hudson Holanda.

Baseando-se nos resultados dos testes anteriormente descritos, coloração de Gram, KOH, catalase, oxidase e oxidação/fermentação da glicose, seguia-se então para a etapa de observação e identificação nas chaves bacterianas, conforme Anexo I. No caso daquelas classificadas como Gram-positivas, já era possível fechar em algum gênero ou espécie. Quando Gram-negativas, seguia-se então o repique em meios seletivos de Ágar MacConkey® e testes bioquímicos específicos para as mais diferentes chaves.

6. IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são Gram-negativas, apresentam resultado negativo frente ao teste da enzima oxidase e positivo no teste da enzima catalase. São microrganismos anaeróbicos facultativos, fermentadores de glicose e também de outros vários açúcares, e crescem bem em Ágar MacConkey®. Têm distribuição mundial, habitam o trato intestinal de seres humanos e animais, e podem contaminar vegetação, água e solo (Quinn et al., 2005).

A identificação das enterobactérias é realizada baseando-se nas características culturais como odor exalado durante o crescimento, através da morfologia e pigmentação das colônias, bem como pela realização de testes bioquímicos complementares (Trabulsi et al., 2005). Para a identificação das principais enterobactérias são utilizados meios sólidos como Ágar CLED®, Ágar EMB® e Ágar MacConkey® (Quinn et al., 1994). Após a análise do crescimento ou não nesses meios, rotineiramente são utilizados os meios bioquímicos para identificação.

6.1. CULTURA EM ÁGAR MACCONKEY®

Após a cultura em meio Ágar Sangue®, observação das características macroscópicas e microscópicas, e suspeita de se tratar de uma enterobactéria, procedeu-se com o repique da colônia inoculando-a em Ágar MacConkey® (Quinn et al., 2005). Com o auxílio de uma alça calibrada, devidamente flambada e fria, coletou-se parte de uma colônia presente em cultura na placa de Ágar Sangue® e a inoculou na placa contendo Ágar MacConkey® através da formação de estria única e central. A placa foi identificada corretamente, e levada para incubação por 24-48 horas à uma temperatura constante de 37°C em estufa para crescimento bacteriológico. Decorrido o período de incubação se fez a análise das colônias quanto à fermentação ou não da lactose.

Este meio apresenta como indicador de pH o vermelho de fenol, além disto contém cristais de violeta e sais de bile que atuam inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas, bem como inibindo o crescimento em “nuvem” de colônias de *Proteus spp* (OXOID, 2000; Quinn et al., 1994). A fermentação de lactose acidifica

o meio e as colônias então adquirem coloração rosada, como pode ser visto na Figura 7. Se as bactérias não possuírem a capacidade de utilizar a lactose, então ao utilizarem peptonas do meio, como fonte de nitrogênio, suas colônias adquirem coloração pálida (Quinn et al., 2005). Estas características servem como triagem na distinção entre as enterobactérias. Por exemplo, bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* apresentam colônias cor de rosa avermelhada, no entanto *Salmonella spp.* e *Proteus spp.* apresentam colônias incolores (Oliveira,2000).



Figura 7: Cultura de *Escherichia coli* em meio Ágar MacConkey®.
Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

6.2. CULTURA EM ÁGAR CLED®

O meio sólido Ágar CLED® (Meio Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos) é bastante utilizado para cultura e contagem de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas principalmente em uroculturas, pois permite o crescimento de todos os microrganismos potencialmente patogênicos presentes na urina, fornecendo uma boa diferenciação das colônias e características diagnósticas claras, além de impedir a formação das “nuvens ou véu” do *Proteus spp.* (OXOID,2000).

A inoculação no meio Ágar CLED® foi feita através de repique de colônias crescidas em placa de Ágar Sangue®. Com o auxílio de uma alça calibrada, previamente flambada e fria, e dentro da área de segurança do bico de Bunsen,

coletou-se parte de uma colônia presente em cultura na placa de Ágar Sangue® e inoculou-se na placa contendo Ágar CLED® através da formação de estria única e central. Essa então foi identificada e levada a estufa de crescimento bacteriológico e mantida incubada por período de 24 horas a uma temperatura constante de 37°C. Decorrido o período de incubação fez-se a análise das colônias, identificação e diferenciação das mesmas de acordo com as características morfológicas evidenciadas meio, de acordo com a Figura 8. Como por exemplo, coloração, diâmetro das colônias, odor exalado, se apresenta aspecto seco ou mucóide, entre outros (Biobrás; OXOID, 2000).

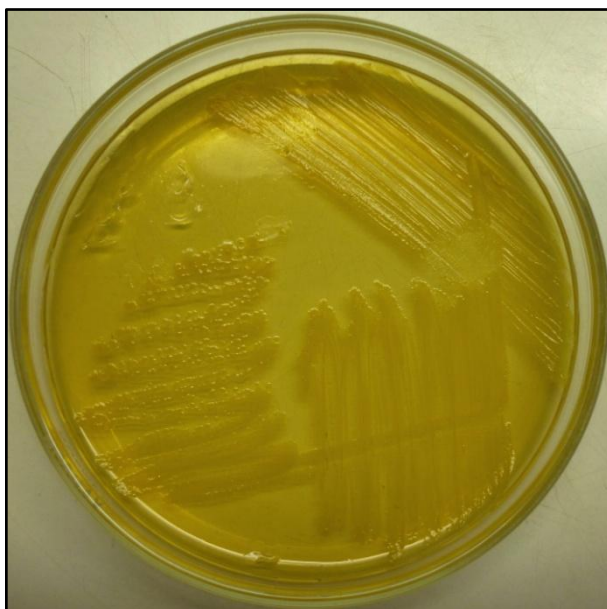


Figura 8: Crescimento bacteriano em meio Ágar CLED® verificado após 24h em estufa a 37°C.
Fonte: Arquivo pessoal.

6.3. CULTURA EM ÁGAR EMB®

O Ágar EMB® (Eosina Azul de Metileno) é considerado meio clássico utilizado para isolamento e diferenciação de enterobactérias, e é ligeiramente inibidor para organismos Gram-positivos (Biobrás). Nesse meio a combinação de eosina de metileno como um indicador promove uma diferenciação distinta entre colônias de organismos fermentadores de lactose e os que não fermentam a lactose. A sacarose foi incluída no meio para detectar os membros do grupo coliforme que fermentam esse carboidrato mais rápido do que a lactose. É o meio utilizado para identificação

de *Escherichia coli*, pois neste meio, esta enterobactéria apresenta característica única, possui um brilho verde-metálico, como evidenciado na Figura 9 (Quinn et al., 1994; Quinn et al., 2005), porém podem apresentar-se também como colônias enegrecidas (Oliveira, 2000).

A inoculação no meio Ágar-eosina-azul de Metileno® foi feita através de repique de colônias crescidas em placa de Ágar Sangue®. Com o auxílio de uma alça calibrada, previamente flambada e fria, e dentro da área de segurança do bico de Bunsen, coletou-se parte de uma alíquota da colônia presente em cultura na placa de Ágar Sangue® e inoculou-a em placa contendo Ágar EMB® através da formação de estria única e central. Essa então foi identificada, e levada à estufa de crescimento bacteriológico e mantida incubada por período de 24-48 horas a uma temperatura constante de 37°C. Posteriormente ao período de incubação seguiu-se com a análise macroscópica das características morfológicas da colônia, verificando tamanho da colônia, aspecto mucóide ou seco, coloração metálica ou não, e se houve fermentação da lactose ou da sacarose primeiramente pelo microrganismo (Quinn et al., 2005).



Figura 9: Crescimento bacteriano em meio Ágar EMB® verificado após 24h em estufa a 37°C. À direita *Escherichia coli* apresentando seu característico brilho verde-metálico.

Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

6.4. TESTES BIOQUÍMICOS

a) Ágar TSI® (Tríplice Açúcar Ferro)

O Ágar TSI® é o meio rotineiramente utilizado para a diferenciação de membros da família *Enterobacteriaceae* através da fermentação de três açúcares (glicose, sacarose e lactose) e produção de sulfeto de hidrogênio. Possui em sua composição: 0,1% de glicose, 1,0% de lactose, 1,0% de sacarose, além de substratos químicos para indicar a produção de ácido sulfídrico (H₂S) e indicador de pH vermelho de fenol (Quinn et al., 1994). Esse meio permite o reconhecimento e exclusão das espécies fermentadoras de sacarose. Tais microrganismos podem fermentar a lactose lentamente, ou não fermentá-la, durante a incubação, mas utilizam facilmente a sacarose (OXOID, 2000).

Todas as enterobactérias são capazes de fermentar a glicose e a pequena quantidade (0,1%) será preferencialmente e rapidamente utilizada. Nesta fase inicial tanto o fundo quanto a superfície irão ficar amarelas devido à produção de ácidos a partir da fermentação da glicose. Algumas bactérias utilizam também lactose ou sacarose, ou ambas, nesse caso a produção de ácido é suficiente para manter o meio acidificado, e então fundo e inclinação mantêm-se amarelados. No caso de bactérias que não são capazes de fermentar tanto lactose quanto a sacarose, depois de degradada a pequena quantidade de glicose, irão utilizar as peptonas disponíveis no meio, o que irá ocorrer preferencialmente na superfície da inclinação devido a presença de oxigênio. Os produtos da utilização das peptonas tem caráter alcalino, o que faz com que o meio retorne a sua coloração original vermelha (Quinn et al., 2005).

A realização do teste consistiu em inocular, com o auxílio de uma alça perfurante devidamente flambada e fria, uma alíquota da colônia no tubo de ensaio contendo meio Ágar TSI®, de forma que o meio foi perfurado até que se alcançou o fundo do tubo, e quando retirado realizou-se semeadura de forma estriada ao longo de toda superfície do Ágar (Oliveira, 2000). Deve-se lembrar sempre de flambar a abertura do tubo, e todo procedimento deve ser realizado dentro da área de segurança do bico de Bunsen. Após o procedimento de inoculação o tubo foi devidamente identificado, e mantido em incubação na estufa de crescimento bacteriológico por 18-24 horas à temperatura constante de 37°C (Oliveira, 2000).

Posterior ao período de incubação procedeu-se com a leitura e interpretação do teste. As possíveis reações observadas foram: fermentação da glicose, onde obtém-se reação ácida no fundo, que se encontrava com coloração amarelada, e reação alcalina na superfície que se apresentou com coloração vermelha, de acordo com a Figura 10A; fermentação de glicose e sacarose, onde obteve-se reação ácida em todo o meio, que apresentou-se inteiramente com coloração amarela tanto no fundo, quanto na superfície, como pode ser visto na Figura 10B; produção de gás, onde bolhas se formaram no fundo do tubo deslocando o ágar; produção de H_2S , em que o fundo do tubo se tornou enegrecido, como evidenciado na Figura 10C. Pode acontecer também que não ocorra fermentação de nenhum açúcar, portanto tanto o fundo quanto a superfície irão se manter na coloração vermelha (Oliveira, 2000).

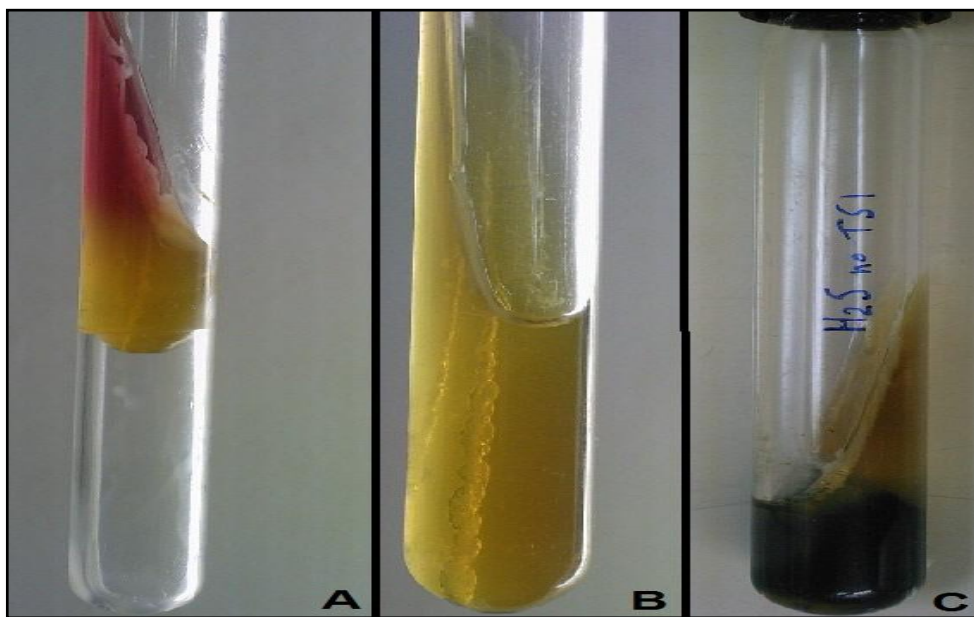


Figura 10:A - Fermentação somente da glicose com formação de gás; B - Fermentação da glicose e sacarose; C- Produção de H_2S .

Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

b) Teste da Descarboxilação da Lisina

O teste da lisina tem por objetivo identificar se a bactéria possui a enzima descarboxilase, capaz de hidrolisar o grupo carboxil do aminoácido lisina presente no meio, formando aminas alcalinas e dióxido de carbono. A lisina é rotineiramente utilizada para identificação de enterobactérias, principalmente na diferenciação de espécies de *Proteus spp.* de espécies de *Salmonella spp.* (Quinn et al., 2005). O

produto da descarboxilação da lisina é a cadaverina. A reação se dá na ausência de oxigênio, por este motivo os meios devem ser selados com uma camada de óleo mineral estéril. O meio contém indicador de pH de bromocresol, que em pH ácido denuncia cor amarela e em pH alcalino a cor púrpura (Trabulsi et al., 2005).

A realização do teste consiste em inocular, com o auxílio de uma alça calibrada devidamente flambada e fria, uma parte da colônia bacteriana em um tubo contendo o Meio Lisina ® e também em um tubo controle sem a presença do aminoácido (Oliveira, 2000). Após o procedimento de incubação, identificou-se adequadamente os tubos e os incubou por 24 horas à temperatura constante de 37°C em estufa para crescimento bacteriológico. Ao serem incubados, os meios inicialmente tornam-se amarelos devido à acidificação do meio a partir do consumo da glicose. Caso ocorra a utilização do aminoácido o meio retomará sua cor inicial púrpura, como pode ser visto na Figura 11, mas se não houver a descarboxilação da lisina o tubo permanecerá amarelo. Em ambas situações o tubo controle sempre apresentará a coloração amarela após o período de incubação, pois a glicose foi sempre consumida (Oliveira,2000). Deve-se lembrar sempre de flambar a abertura do tubo, e realizar todo o procedimento dentro da área de segurança do bico de Bunsen.

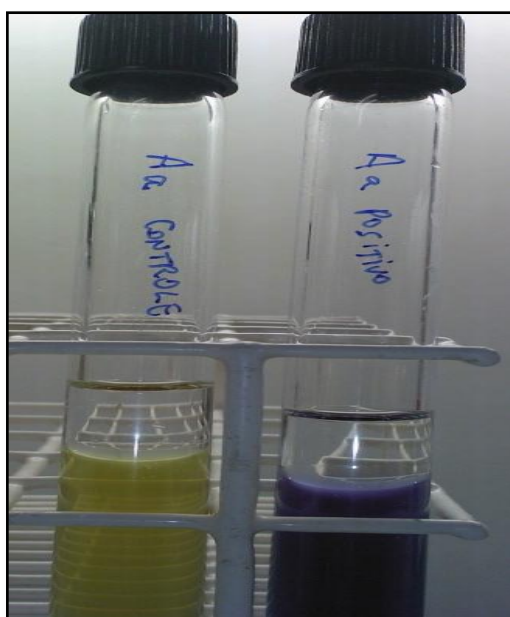


Figura 11: Teste de Descarboxilação da Lisina; Controle positivo em amarelo e amostra positiva em roxo.

Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

c) Outros Testes Bioquímicos Complementares

A diferenciação de enterobactérias é realizada presuntivamente a partir das observação das características macroscópicas das colônias nos diferentes ágar, bem como a partir também das reações observadas no Ágar TSI® e no teste da descarboxilação da lisina (Quinn et al., 2005). A partir dessas observações e da interpretação desses dois testes bioquímicos segue-se com a realização de uma série de outros testes bioquímicos complementares específicos para o diagnóstico definitivo das enterobactérias conforme descrito no Anexo II.

7. TESTE DA DIFUSÃO EM DISCO (ANTIBIOGRAMA)

Uma vez identificada a bactéria e feito o diagnóstico clínico, é de interesse clínico saber identificar quais antimicrobianos serão eficazes no combate desse microrganismo, para que se alcance a eliminação do patógeno e consequentemente se tenha sucesso no tratamento da doença. A técnica da Difusão em Disco (Antibiograma) consiste em determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* de uma determinada linhagem isolada frente a agentes antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA; LABORCLIN, 2011).

A metodologia de Kirby & Bauer para antibiograma é a mais difundida e utilizada até hoje na rotina de análises clínicas, devido a sua praticidade de execução, baixo custo e confiabilidade de seus resultados. Apesar de sua relativa simplicidade de execução, a técnica em questão exige que as instruções sejam seguidas rigorosamente de forma que os resultados obtidos correspondam à realidade e possam ser comparados com as tabelas internacionais de leitura (LABORCLIN, 2011).

O procedimento consiste no preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente, inoculação dessa suspensão na superfície de uma placa de Ágar Mueller Hinton® e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Após a incubação em estufa, é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo então medido o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise (LABORCLIN, 2011).

O antibiograma somente pode ser realizado em bactérias previamente isoladas e identificadas, e sempre dentro da área de segurança do bico de Bunsen. Primeiramente com o auxílio de uma alça calibrada, devidamente flambada e fria, coletou-se parte de uma colônia presente em cultura na placa de ágar e a inoculou em tubo de ensaio contendo Caldo Muller Hinton®, encaminhado e mantido na estufa para crescimento bacteriológico a temperatura constante de 37°C até que houvesse turvação do meio. Após isto, retirou-se o tubo de ensaio da estufa e, com auxílio de um *swab* estéril mergulhado no meio se inoculou e espalhou-se o caldo em várias direções em uma placa de Petri grande contendo Ágar Muller Hinton®, certificando-se de que este ficou completamente coberto pelo caldo contendo a amostra. No caso de microrganismos de difícil crescimento utilizou-se Ágar Muller Hinton® acrescido de sangue. Após a placa estar totalmente coberta, com auxílio de uma pinça previamente esterilizada pelo fogo e já novamente fria, pinçou-se um disco de antibiótico de dentro do frasco e coloca-lo firmemente sobre o Ágar (LABORCLIN, 2011).

Esse procedimento foi realizado com todos os antimicrobianos previamente escolhidos e definidos de acordo com a indicação e solicitação do médico veterinário requisitante. Os discos foram dispostos difusamente de forma que estivessem localizados mais distante possível um do outro, como demonstrado na Figura 12A, para que não houvesse áreas de sobreposição de ação entre os diversos antibióticos (LABORCLIN, 2011). A pinça e a entrada do frasco de antibióticos foram sempre flambadas no bico de Bunsen a cada repetição, e o disco de antibiótico não teve nenhum contato com qualquer outra superfície, pois isso implicaria em contaminação do mesmo. Uma vez todos os discos colocados sobre o ágar, este foi mantido na estufa de crescimento bacteriológico a temperatura constante de 37°C por 18-24h.

Decorrido o tempo de incubação, a leitura dos resultados foi feita através de uma régua, paquímetro ou dispositivo semelhante, a fim de se medir o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco, para então consultar uma tabela apropriada e determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado, como evidenciado nas Figuras 12B e 12C (LABORCLIN, 2011). Existe uma tabela de antibióticos disposta no laboratório que auxilia na

conversão de siglas relacionadas a cada antibiótico, pois estas variam de acordo com o fabricante.

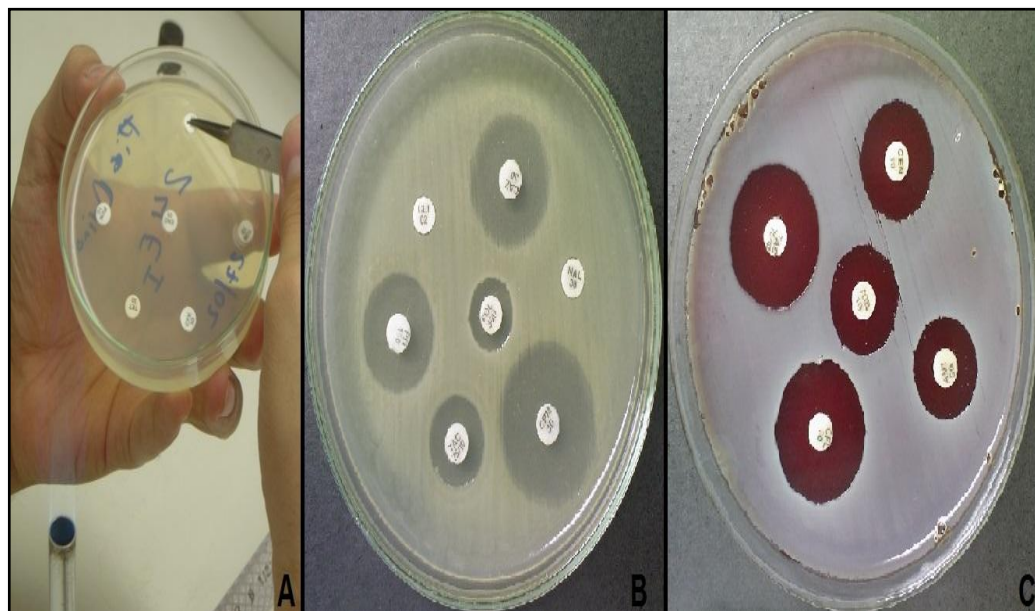


Figura 12:A - Colocação dos discos com antibióticos na placa com meio Muller Hinton®; B - Halos de inibição em meio Muller Hinton®; C - Halos de inibição em meio Muller Hinton Sangue®. Verificados após 24h em estufa a 37°C.
Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

8. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS A PARTIR DE SWABS DE OUVIDO

As leveduras são microrganismos eucariotas, unicelulares, redondos ou ovais e com compartimento único. Crescem aerobicamente em Ágar Sabouraud Dextrose®, e aquelas espécies capazes de invasão tecidual crescem bem a 37°C. As colônias geralmente são de textura cremosa e úmida, de coloração opaca e assemelham-se a grandes colônias bacterianas. São frequentemente encontradas no meio ambiente, em plantas e em materiais de plantas, também podendo ocorrer como comensais na pele ou nas membranas mucosas de animais, causando frequentemente infecções. A *Malassezia spp.* pode ser encontrada na pele de mamíferos e nas aves, particularmente junto a regiões ricas em glândulas sebáceas. Em cães está associada principalmente a otites externas. Quando presentes em grandes quantidades aparentemente induzem excessiva secreção sebácea, que juntamente com a ação da levedura e acúmulo de cera contribuem para alterações

inflamatórias, e então este exsudato inflamatório e restos necróticos acumulam-se no canal causando intenso incômodo ao animal (Quinn et al., 2005).

8.1. CULTURA E ISOLAMENTO

A semeadura de amostras coletadas através do uso de *swabs* estéreis foi feita de forma direta sem a utilização de alças calibradas. Dentro da área de segurança do bico de Bunsen e com auxílio de uma pinça hemostática cirúrgica devidamente flambada e fria, segurou-se diretamente o *swab* e procedeu-se com a inoculação em meio Ágar Sabouraud Dextrose® através formação de estria central.

O Ágar Sabouraud Dextrose® é um meio de pH ácido utilizado rotineiramente principalmente para isolamento de leveduras, mas também pode ser utilizado para culturas gerais em micologia. Nele os fungos mantêm sua aparência típica e, assim, podem ser facilmente identificados de acordo com as características macroscópicas descritas por Sabouraud. É frequentemente utilizado com antibióticos para isolamento de fungos patogênicos a partir de amostras contaminadas por bactérias (OXOID, 2000).

Findadas as inoculações, o meio foi imediatamente incubado por 3 a 5 dias, a uma temperatura constante de 37°C em estufa apropriada para culturas bacteriológicas, porém colônias de *Malassezia spp.* já podem ser visualizadas após apenas 24 horas. Decorrido o período de incubação, a placa semeada foi levada para análise na bancada junto a área de segurança do bico de Bunsen, para observação se houve crescimento fúngico. Identificado o crescimento de colônias, como pode ser visto na Figura 12A, procedeu-se com preparo de lâmina e coloração pelo método de Gram, da mesma forma que foi feito para visualização e identificação de bactérias junto ao microscópio óptico, seguindo exatamente o mesmo passo a passo (Brasil, 2010b).

Essas leveduras absorvem o corante violeta genciana, apresentando então coloração roxa. Finalizado o preparo da lâmina, e essa já estando seca, seguiu-se para visualização da mesma em microscópio óptico. Adicionou-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e então se procedeu com a focagem. Através da visualização na microscopia pode-se identificar as leveduras. As células de *Malassezia spp.* apresentam forma característica, semelhante ao formato de

pegadas, com parede grossa e até 6,5µm de comprimento e reproduzem-se por brotamento monopolar sobre uma base larga, como pode ser visto na Figura 13B. (Quinn et al., 2005).

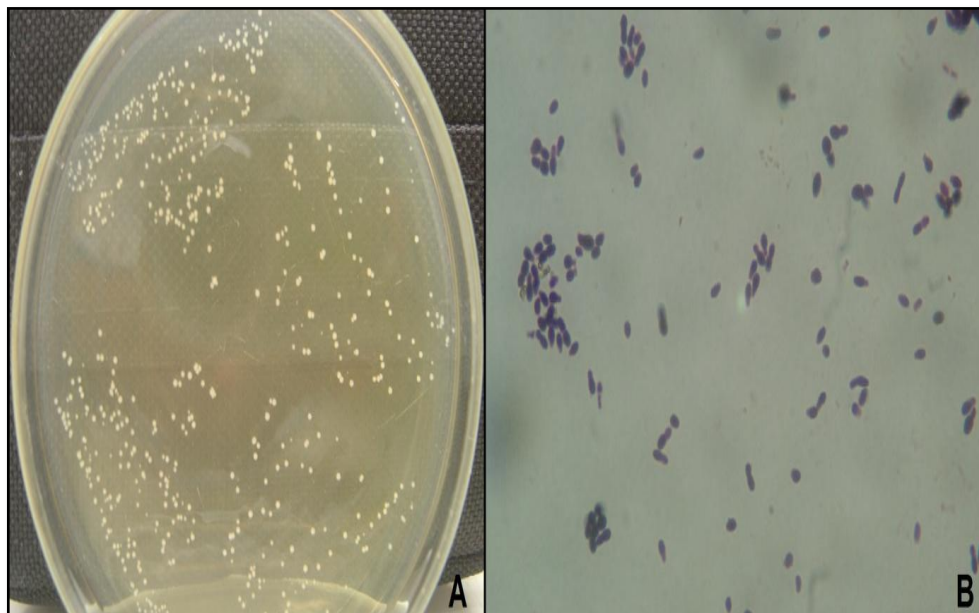


Figura 13:A - Cultura de *Malassezia spp.* em meio Ágar Sabouraud Dextrose® verificada após 24h em estufa a 37°C; B - Visualização de *Malassezia spp.* em microscopia óptica em aumento de 1000x..
Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

9. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são fungos septados que invadem estruturas superficiais queratinizadas, como pele, cabelos, pelos e unhas. Mais de 30 espécies destes fungos são reconhecidas, muitas pertencem aos *Fungi Imperfecti* e são classificados em 3 gêneros anamórficos: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Os dermatófitos são aeróbios estritos, a maioria cresce lentamente em Ágar Sabouraud Dextrose® e Ágar Micobiótico®, as colônias de muitos desses fungos são pigmentadas, e a morfologia colonial juntamente com o tipo de macroconídio produzido são os principais aspectos considerados para identificação. A morfologia macroconidial é avaliada a partir de montagens feitas com fitas adesivas transparentes com amostras de colônias coradas por lactofenol azul de algodão (Quinn et al., 2005).

A inoculação da amostra em Ágar Micobiótico® é realizada dentro da área de segurança do bico de Bunsen e com auxílio de uma pinça hemostática cirúrgica devidamente flambada e fria, segurando-se diretamente a amostra do tecido animal e inocula-se firmemente sobre o meio. Esse meio é indicado para cultura seletiva de fungos patogênicos a partir de amostras biológicas contaminadas com microbiota mista, como cabelos, raspados de pele, pelos e unhas. A presença de antimicrobianos inibe o crescimento de fungos saprófitas e de bactérias (Biobrás).

Após a inoculação, a placa é incubada por período mínimo de 15 dias, à temperatura ambiente entre 20-25°C (Brasil, 2010b). Decorrido o período de incubação e confirmada a formação de colônias, como evidenciado na Figura 14A, procedeu-se com o preparo da lâmina. O preparo é bastante simples, rápido e eficaz. Colocou-se uma gota de lactofenol azul de algodão em uma lâmina para microscopia, previamente identificada, e com o auxílio de uma pinça hemostática, devidamente flambada e fria, se segurou a extremidade de um pedaço de fita adesiva e coletou-se parte de uma colônia presente em cultura na placa de ágar, encostando a parte adesiva da fita levemente sobre a mesma, dando preferência as extremidades da colônia. Após a coleta de fragmentos da colônia depositou-se a fita sobre a gota do corante presente na lâmina, fixando-a na lâmina. Finalizado o preparo da lâmina, seguiu-se para visualização da mesma em microscópio óptico. A identificação de macroconídios em grande quantidade e em diferentes estágios de crescimento confirma o diagnóstico positivo, de acordo com a Figura 14B (Brasil, 2010b; Quinn et al., 2005).

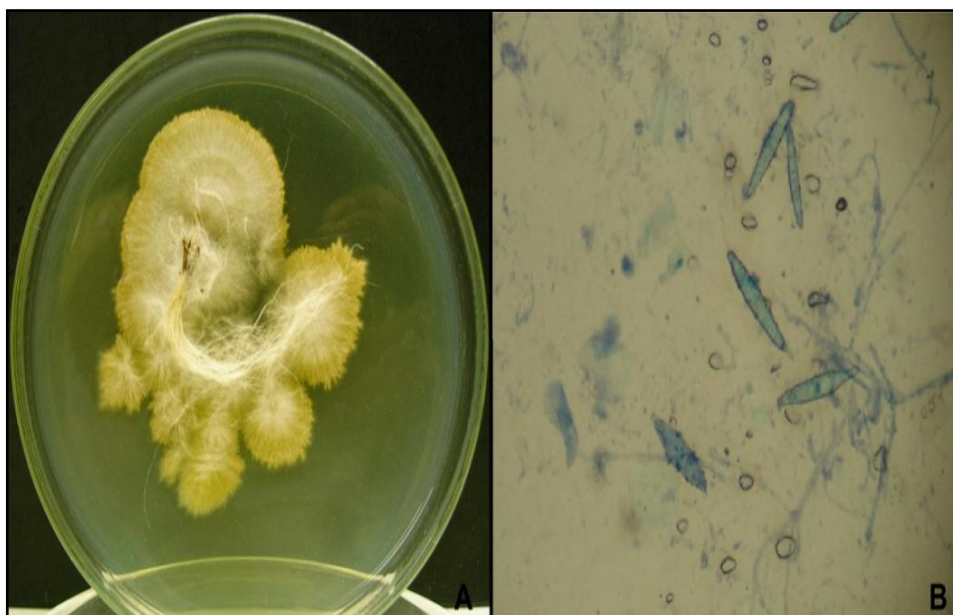


Figura 14: A - Cultura de fungo dermatófito em meio Ágar Micobiótico® verificado após 15 dias a temperatura ambiente de 25°C; B - Visualização dos macroconídios de fungos dermatófitos corados com lactofenol azul de algodão em microscopia óptica em aumento de 400x.

Fonte: Cedido por Msc. Hudson Holanda.

10. CASUÍSTICA

A casuística apresenta-se dividida em dois gráficos, de acordo com os gêneros e/ou espécie de bactérias isoladas das mais variadas amostras (Gráfico 2) e dos fungos identificados (Gráfico 3).

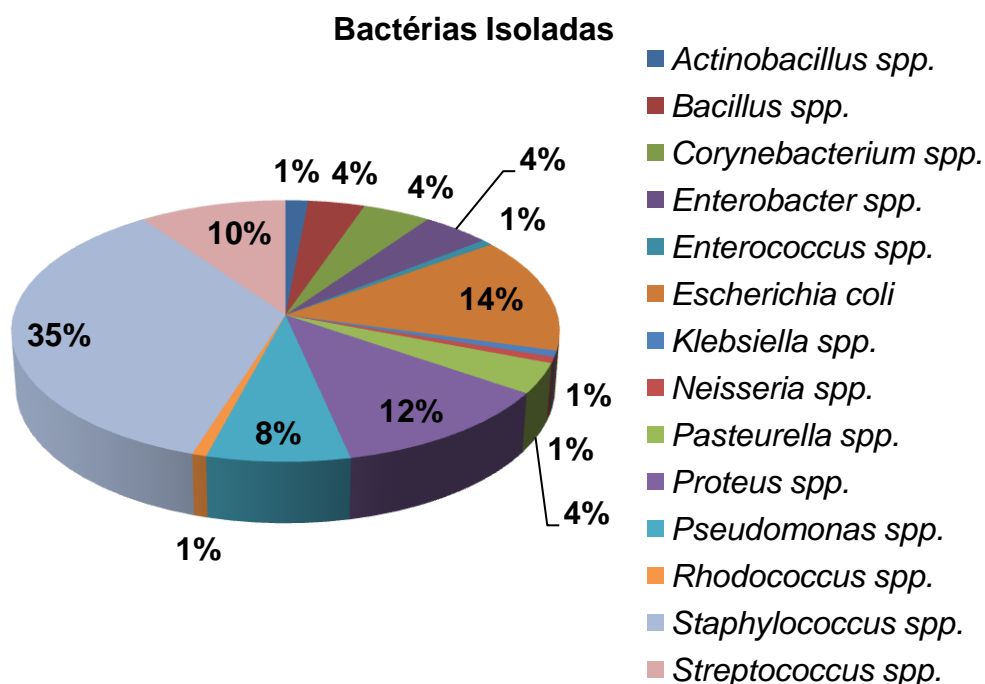


Gráfico 2: Relação dos gêneros das bactérias isoladas na rotina do laboratório durante o período acompanhado; Número total de amostras igual a 133.

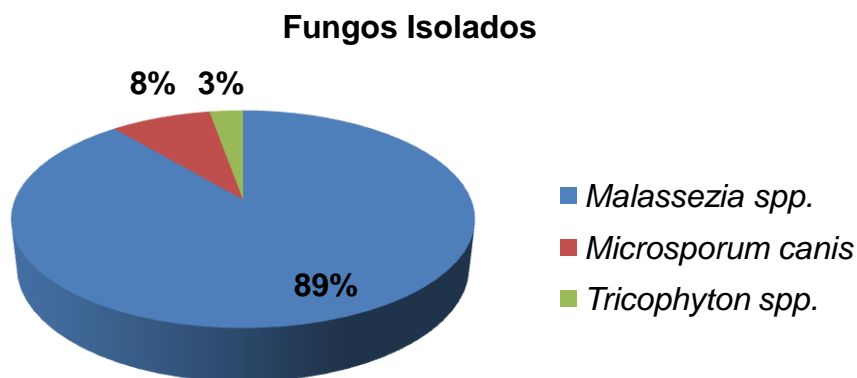


Gráfico 3: Relação dos gêneros e espécies dos fungos isolados na rotina do laboratório durante o período acompanhado; Número total de amostras igual a 36.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças infecciosas se destacam entre as doenças mais importantes dos animais domésticos. Compete ao Médico Veterinário ser capaz de reconhecê-las e controlá-las. Para isso é necessário compreender a morfologia, citologia, estrutura, fisiologia, metabolismo e genética de microrganismos, classificados como agentes

microbianos, a fim de se ter noções de sua patogenicidade, para que se consiga alcançar um diagnóstico correto e se estabeleça prevenção e tratamentos adequados. Neste aspecto a microbiologia desempenha papel fundamental e imprescindível na identificação e caracterização dos patógenos, através de diagnósticos laboratoriais precisos. Hoje esta área ocupa uma posição central no currículo da Medicina Veterinária, e exerce papel de suporte indispensável para que se tenha sucesso nas atividades da clínica, nas suas mais diversas especialidades.

A realização de estágio supervisionado no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB foi de considerável importância, proporcionando uma ótima oportunidade de aprendizado prático na área, fixação de conhecimento teórico, desenvolvimento de pensamento clínico e vivência prática hospitalar-laboratorial, além de promover amadurecimento profissional e ético através do convívio diário com diversos profissionais da área veterinária.

As análises de rotina e seus resultados ajudaram no aprofundamento dos conhecimentos técnicos, bem como na maior compreensão do papel do Médico Veterinário na identificação, controle e erradicação das doenças. Da mesma forma, as linhas de pesquisa também exerceram influência positiva durante o período no laboratório, ao despertarem a curiosidade e aguçarem ainda mais o interesse pela área, ao vivenciar o empenho e dedicação com que estes profissionais se comprometem dia a dia a fim de cada vez mais contribuir com a evolução e crescimento desta área.

REFERÊNCIAS

BIOBRÁS. **Catálogo de Meios de Cultura**. Biobrás diagnósticos S.A.

BRASIL. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Modulo V: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**, Anvisa/Ministério da saúde, 1ª edição, 2010a.

BRASIL. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Modulo VII: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**,Anvisa/Ministério da saúde, 1ª edição, 2010b.

BRASIL. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Modulo IV: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**, Anvisa/Ministério da saúde, 1ª edição, 2010c.

BRASIL. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Principais Síndromes Infeciosas**, Anvisa/Ministério da saúde, 1ª edição, 2004.

BRASIL. **Programa Nacional de DST e Aids - Técnica de Coloração de Gram**,Secretaria de Políticas de Saúde/Ministério da saúde, 2001.

LABORCLIN. **Manual para Antibiógrama, Difusão em Disco (Kirby & Bauer)**. Pinhais: LABORCLIN, 2011.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária, Guia Bacteriológico Prático**. Canoas: ULBRA, 2ª Edição, 2000.

OXOID. **Manual Oxoid**. Hampshire: Oxoid Brasil Ltda.,1ª Edição, 2000.

QUINN, P.J., CARTER, M. E., MARKEY, B., CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Dublin: Wolfe, 1ª Edição, 1994. 648p.

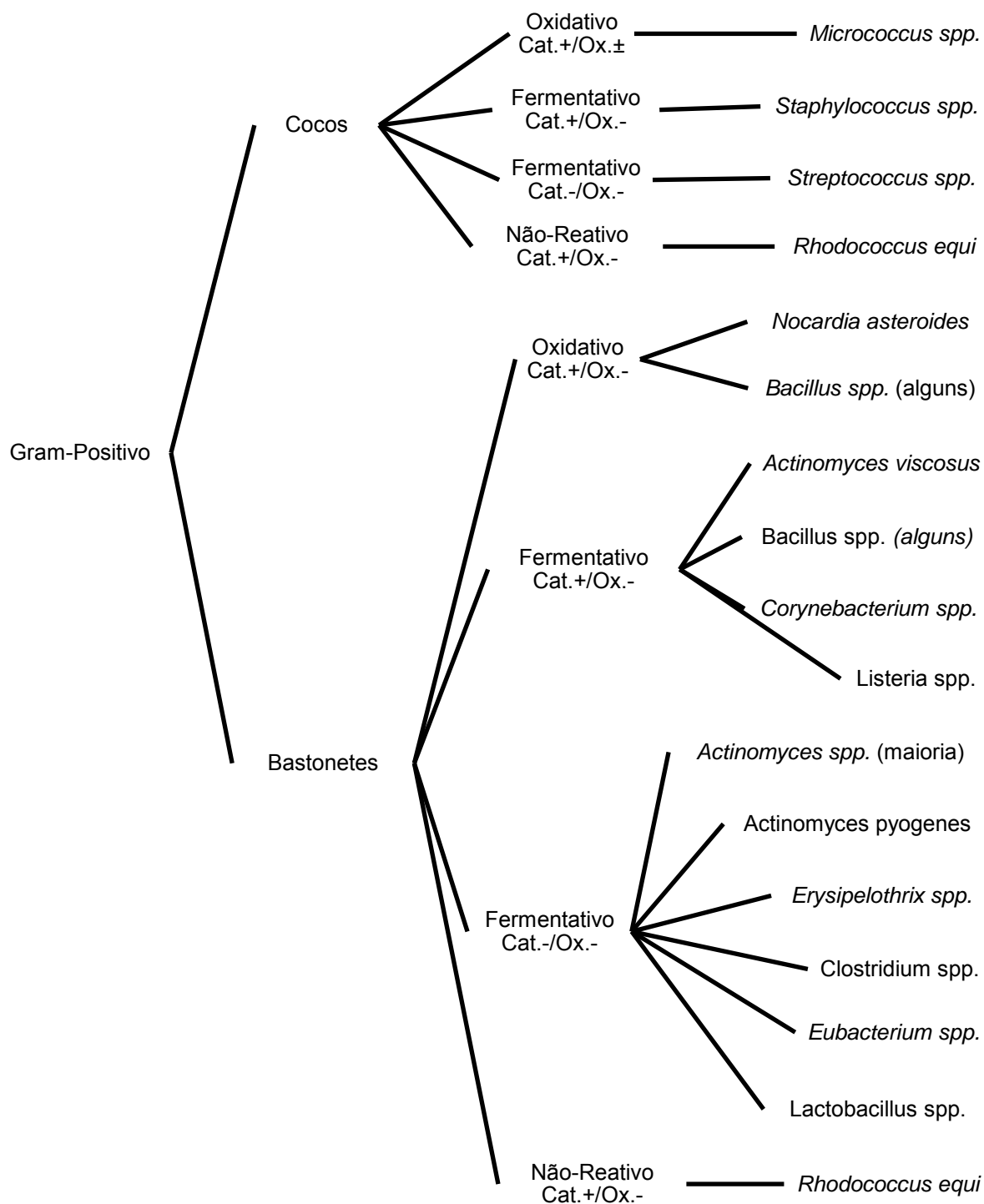
QUINN, P. J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELEY, W. J. C., LEONARD, F. C., MAGUIRE, D. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 1ª Edição, 2005. 512p.

SOARES, I. A., NISHI, M. Y. C., WAGNER, L. H. **Isolamento das Bactérias Causadoras de Infecções Urinárias e Seu Perfil de Resistência aos Antimicrobianos**, Revista Brasileira Médica Farmacêutica e Comunitária, Rio de Janeiro, v.2, nº 6, jul / set 2006.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., MARTINEZ, M. B., CAMPOS, L. C., GOMPERTZ, O. F., RÁCZ, M. L. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 4ª Edição, 2005.

ANEXO I

CHAVE BÁSICA DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS (Quinn et al., 2005).



CHAVE BÁSICA DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS (Quinn et al., 2005).



ANEXO II

TESTES BIOQUÍMICOS PARA ENTEROBACTÉRIAS IMViC (Indol, vM, Vp e Citrato).

IMViC (+ + - -)	H ₂ S (TSI)	Ureia	Fenilalanina	Sacarose	Lisina
<i>Edwardsiella</i> spp	+	-	-	-	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	(-)	-	(+)	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	(+)	(+)
<i>Morganella morganii</i>	-	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	+	-
<i>Shigella</i> spp	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	(+)	-	+	-

IMViC (- - + +)	Lisina	Arginina	Ornitina	Lactose	Pigmento
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+	ausente
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	-	(+)	ausente
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	+	ausente
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	+	-	ausente
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	+	ausente
<i>Serratia liquefaciens</i>	v	-	+	v	vermelho
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	-	vermelho
<i>Serratia rubidaea</i>	(+)	-	-	+	vermelho

IMViC (- + - +)	H ₂ S (TSI)	Fenilalanina	Ornitina	Salicina	Pigmento
<i>Citrobacter freundii</i>	v	-	v	v	ausente
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	(-)	-	v	ausente
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	+	v	ausente
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	(+)	ausente
<i>Salmonella</i> spp	+	-	+	-	ausente
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	+	+	vermelho

IMViC (- + - -)	Fenilalanina	Lisina	Ornitina	Salicina	Rhamnose
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(-)	-	-	v	(+)
<i>Hafnia alvei</i>	-	+	+	v	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	(+)	-
<i>Salmonella</i> spp	-	+	+	-	+
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	v	-	v
<i>Shigella</i> spp	-	-	v	-	v
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	+	v	-
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	-	v	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	-	v	+

IMViC (- + + +)	H ₂ S (TSI)	Uréia	Fenilalanina	Lisina	Arabinose	Pigmento
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	(-)	(-)	-	+	ausente
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	+	+	ausente
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	+	+	ausente
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	-	-	ausente

<i>Serratia liquefaciens</i>	-	v	-	v	+	vermelho
<i>Serratia marcescens</i>	-	(-)	-	+	-	vermelho
<i>Serratia rubidaea</i>	-	-	-	(+)	+	vermelho

IMViC (- + + -)	H ₂ S (TSI)	Ornitina	Gelatina	Manitol	Pigmento
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	-	+	ausente
<i>Hafnia alvei</i>	-	+	-	+	ausente
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	-	ausente
<i>Serratia rubidaea</i>	-	-	+	+	vermelho
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	+	-	+	ausente

IMViC (+ + - +)	H ₂ S (TSI)	Fenilalanina	Ornitina	Manitol
<i>Citrobacter spp</i>	-	-	v	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	(-)	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-
<i>Providencia spp</i>	-	+	-	v

IMViC (- - - -)	Maltose	Rhamnose	Lisina	Sacarose
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(+)	(+)	-	(+)
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	-
<i>Yersinia pestis</i>	(+)	-	-	-

IMViC (- - - +)	Ornitina	Gelatina	Sacarose	Pigmento
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	(+)	ausente
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	-	ausente
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	+	vermelho

IMViC (- - + -)	Ornitina	Gelatina	Rhamnose	Sacarose	Pigmento
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	(+)	(+)	ausente
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	+	-	ausente
<i>Serratia rubidaea</i>	-	+	-	+	vermelho

IMViC (+ + + +) ou (+ - + +)	Lisina
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+

IMViC (+ + + -)	Ornitina
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+

IMViC (+ - - +) ou (+ - - -) ou (+ - + -)	<i>Enterobacter agglomerans</i>
---	---------------------------------

Legenda

(+): maioria das amostras positivas

(-): maioria das amostras negativas

v: variável